VERDAUUNGSVERSUCHE

AN

KATALASELÖSUNGEN MIT PROTEOLYTISCHEN UND PEPTOLYTISCHEN FERMENTEN

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER HOHEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT LEIPZIG

VORGELEGT

VON

KURT WINKLER

ACAD.
LUGD. BAT.
BIBL.

LEIPZIG
DRUCK VON AUGUST PRIES
1915

Angenommen von der III. Sektion auf Grund der Gutachten der Herren Steche und Pfeffer.

Leipzig, den 27. Juni 1914.

Der Procancellar.
Kirchner.

(Sonderabdruck aus: »Fermentforschung«. I. S. 105—130.)

[Aus dem zoologischen Institut der Universität Leipzig.]

Verdauungsversuche an Katalaselösungen mit proteolytischen und peptolytischen Fermenten.

Von

Kurt Winkler.

Einleitung.

In letzter Zeit sind von Waentig und Steche[1]) Versuche über die Wirkung von Verdauungsfermenten auf Katalase ausgeführt worden. Sie finden für dieses Ferment, das Wasserstoffsuperoxyd unter Bildung von Wasser und molekularem Sauerstoff zerlegt, eine Trypsinempfindlichkeit. Es ergab sich daraus die Wahrscheinlichkeit, daß die Katalase ein eiweißartiger Körper ist. Sie konnten dagegen feststellen, „daß in sehr schwachsaurer Lösung, bei der beispielsweise die Verdauung von Edestin noch sehr prompt vor sich geht, Pepsin auf die Katalase nicht einwirkt, wenn man diejenige Wirkung unberücksichtigt läßt, welche die Säure für sich ausübt."

Infolge „der spezifischen Trypsinempfindlichkeit der Katalase" denken die beiden Verfasser weiter an „die Möglichkeit eines Nachweises tryptischer Verdauungsfermente". So glauben sie auch „durch den engen Anschluß des Krebsmagensaftes an das Trypsin in seinem Verhalten gegen Katalase dessen nicht ganz unwidersprochen tryptische Natur von neuem erwiesen" zu haben.

Zweitens ergibt sich aus ihren Versuchen eine verschiedenartige Angriffsfähigkeit der beiden Verdauungsenzyme, Trypsin und Krebsmagensaft, gegenüber Blutkatalase, und eine unterschiedliche Resistenz von Katalasen verschiedener Herkunft gegenüber der gleichen Protease. Fraglich war es, ob diese Verschiedenheiten ihre Erklärung in der Annahme verschiedener Katalasen bzw. Proteasen fanden.

Im folgenden sind diese Verhältnisse näher untersucht worden.

Ich möchte mir gestatten, an dieser Stelle den Herren Privatdozenten Dr. phil. et med. Steche und Dr. phil. Waentig meinen Dank auszu-

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie **83**.

sprechen für das rege Interesse, das sie jederzeit meiner Arbeit entgegenbrachten.

Die Untersuchungen wurden zum größten Teil im Zoologischen Institut zu Leipzig angestellt, einige Versuche im Laboratorium für angewandte Chemie.

Material und Versuchsanordnung.

Als Katalaselösungen kamen meist die ungereinigten Extrakte aus den Geweben der verschiedensten Tiergruppen zur Verwendung. Das Material dazu wurde fast ausschließlich auf Exkursionen gesammelt. Außerdem wurde mehrere Male gereinigte Katalase aus Rinderblut hergestellt. Fast immer nach dem Verfahren von Senter[1]) wurde Blutkatalase gewonnen, nur einmal nach den Angaben von Ewald[2]). Bei den Katalasen der wirbellosen Tiere war es selten möglich, durch Alkoholfällungen gereinigte, aktive Extrakte zu erhalten. Vom Erfolg begünstigt waren nur die Versuche bei der Weinbergschnecke (Helix pomatia) und der Wegschnecke (Arion empiricorum). Durch Versetzen einer gemessenen Menge Wasserextrakt von Helix- oder Arion-Darm oder -Leber mit der anderthalbfachen Menge 96proz. Alkohols wurden feinflockige Niederschläge in der Extraktflüssigkeit erhalten. Die in dem Filtrat noch vorhandene Katalase konnte durch weiteren Zusatz von Alkohol nicht mehr ausgefällt werden. Der getrocknete Niederschlag ergab nun nach dem Zerreiben und einer darauf folgenden Extraktion mit destilliertem Wasser eine aktive Katalase, die mehrere Monate hindurch aktiv blieb.

Als tryptische Verdauungsfermente wurden die Lösungen zweier käuflicher Präparate benutzt, und zwar Trypsin Merck und Trypsin Kahlbaum. Zur Untersuchung anderer Verdauungsfermente mittels Katalase kamen neben dem Magensaft des Krebses (Astacus fluviatilis) noch die Darm- oder Leberextrakte verschiedener wirbelloser Tiere zur Anwendung. Über die Herstellung dieser Extrakte werde ich bei den einzelnen Versuchen Angaben machen. Ebenso werden die Versuche über die Gewinnung eines ereptischen Verdauungsfermentes in einem folgenden Kapitel angegeben werden.

Wollte man nun bestimmte Schlüsse über die verschiedenartige Wirkung zweier Proteasen auf Katalase ziehen, so war es notwendig, von jenen ungefähr gleich wirksame Lösungen zu erhalten. Waentig und Steche bestimmen die Aktivität von Trypsin und Krebssaft nach

1) Senter, Das Wasserstoffsuperoxyd zersetzende Enzym des Blutes. Zeitschr. f. physikal. Chemie **51**, 673, 1905.

2) Ewald, Die Physiologie der oxydativen Blutfermente. Pflüg. Arch. **116**, 334, 1906.

der Fuldschen Edestinprobe zur Pepsinmessung. Sie wenden diese in etwas abgeänderter Form an, indem sie die nach Fulds Vorschrift[1]) hergestellte saure Edestinlösung neutralisieren, darauf mit verschiedenen Mengen Trypsin oder Krebsmagensaft versetzen, dann nach einer bestimmten Digestionszeit das Reaktionsgemisch wieder ansäuern und mit einer Kochsalzlösung die unverdauten Produkte ausfällen. Nach ihren Versuchen „ergab sich, daß der Magensaft in der Verdünnung 1:15 bis 1:20 etwa die gleiche Aktivität besitzt, wie eine Trypsinlösung 3:1000".

Auf ausgeflocktes Edestin besitzen die proteolytischen Fermente keine Wirkung mehr. Nun ist nicht möglich, die saure Edestinlösung genau zu neutralisieren, ohne daß das Edestin ausflockt. Nach Fulds Angaben soll diese Erscheinung deshalb zustande kommen, weil das Edestin in Säure gelöst, zum sogenannten Edestan wird, einem Stoff, der die Löslichkeit in neutraler Lösung nicht mehr besitzt. Infolge der Nichtneutralisierbarkeit der sauren Edestinlösung ist diese für tryptische Verdauungsfermente ein ungünstiges Subtrat, da ja das Optimum der Trypsinwirkung bei einer schwach alkalischen Reaktion liegt. Im Gegensatz dazu kann ja das bis jetzt noch nicht festgestellte Wirkungsoptimum des Krebsmagensaftes bei schwachsaurer oder neutraler Reaktion sein. Ich habe deshalb meist die alte Fibrinmethode verwendet und konnte feststellen, daß Trypsinlösung in der bedeutend geringeren Konzentration 1,4:1000 und Krebssaft in der Verdünnung 1:20 auf eine gleich große Fibrinflocke die gleiche Wirkung haben.

Die Aktivitätsbestimmung an anderen proteolytischen Fermenten wirbelloser Tiere auch im Vergleich zu Trypsin- oder Krebsmagensaftlösungen konnten infolge Mangels an genügendem Material nicht ausgeführt werden. Die Wirkung der Proteasen wirbelloser Tiere auf genuines Eiweiß wurde an einer Fibrinflocke beobachtet.

Bei der Anordnung meiner Verdauungsversuche hielt ich mich eng an die Vorschriften von Waentig und Steche. Eine gemessene Menge des Katalase-Extraktes wurde mit der gleichen, doppelten oder dreifachen Menge Verdauungsflüssigkeit versetzt. Das Gemisch wurde mit Chloroform oder Toluol als Antiseptikum bei Zimmertemperatur stehen gelassen, oder in dem Thermostaten bei Bruttemperatur aufbewahrt. Es wurden dann meist sofort oder nach 10 bis 20 Minuten Entnahmen aus dem Reaktionsgemisch gemacht zur Bestimmung der vorhandenen Katalasemenge. Nach bestimmten Zeiten folgten neue Entnahmen. Die Aktivitätsbestimmung der Katalase geschah mittelst der Kaliumpermanganatmethode. Die Kon-

1) Fuld und Levisohn, Pepsinbestimmung mittelst der Edestinprobe. Zeitschr. f. biol. Chemie 6, 473, 1907.

zentration der Katalase wurde meist so eingestellt, daß zur Bestimmung der K-Werte 1 ccm Extrakt zu 250 ccm H_2O_2 $\frac{1}{400}$ n kamen. Die Titration erfolgte durch $^1/_{100}$ n Kaliumpermanganat.

Waentig und Steche machen noch darauf aufmerksam, daß sich manchmal schon bei Zimmertemperatur ein spontaner Aktivitätsrückgang der Katalaselösungen bemerken läßt. Es wurde deshalb neben dem Verdauungsgemisch stets eine mit Wasser auf die gleiche Verdünnung gebrachte Katalaselösung unter den gleichen Bedingungen untersucht.

Verdauungsversuche an Katalase mit Proteasen wirbelloser Tiere.

Zunächst sollte festgestellt werden, ob außer dem Krebssaft noch Verdauungsfermente anderer wirbelloser Tiere gleich dem Trypsin der Wirbeltiere einen Abbau von Katalaselösungen bewirken.

Die ersten Versuche wurden mit dem Darmextrakt vom Regenwurm (Lumbricus terrestris) angestellt. Die Herstellung dieses Extraktes ist sehr einfach. Von jedem einzelnen Tiere, das vorher mit Filtrierpapier gefüttert wurde, wurde der Darm in seiner ganzen Länge sorgfältig herauspräpariert, gewogen, zerrieben und mit einer gemessenen Menge von destilliertem Wasser verdünnt und extrahiert. Das erhaltene Filtrat war eine klare, schön gelbe, meist sauer reagierende Flüssigkeit, die eine Fibrinflocke außerordentlich kräftig verdaute. Da sehr oft mit den Darmextrakten von Regenwürmern Versuche gemacht wurden, so wurden, um immer das nötige Material schnell zur Verfügung zu haben, die Darmstückchen von Regenwürmern nach einem Verfahren von Frédéricq[1]) getrocknet und konserviert. Der Darm von einem Regenwurm wurde fein zerschnitten, dann meist über Nacht in 96proz. Alkohol liegen gelassen. Am andern Morgen wurde der Alkohol abgegossen, der Rückstand getrocknet und bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Inwieweit der Alkohol schädigend auf das proteolytische Ferment einwirkte, wurde nicht festgestellt. Jedenfalls besaß ein Wasserauszug eines so behandelten Darmes in starker Verdünnung eine große fibrinverdauende Kraft. Ebenso war noch eine kräftige Wirkung auf Wasserstoffsuperoxyd vorhanden. Diese war bei der Anordnung der Verdauungsversuche hindernd. Erstens war es selten möglich, Extrakte mit solch hohen Katalasewerten zu finden, wie sie der Darm des Regenwurms zeigte. Zweitens ergaben sich bei

1) Frédéricq, Sur la digestion des albuminoides chez quelques invertébrés. Bull. de l'Acad. royale de Belgique **II**, Serie 46, 213, 1878; Arch. de Zoologie **VII**, 391, 1878.

dem Mischen der Darmkatalase mit einer anderen Katalase nicht die Werte, die sich nach der Berechnung ergeben mußten. Es wurde daher versucht durch Zerstörung der Darmkatalase die Darmprotease des Regenwurms allein zu erhalten. Bei einer Extraktion der getrockneten Darmstückchen in der Verdünnung 1:12 erhielt man 8 ccm Extraktionsflüssigkeit. Diese wurde nach und nach mit doppeltnormal Natriumhydroxyd solange versetzt, bis auf Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd keine Blasen mehr auftraten. Die Flüssigkeit wurde dann 1 bis 2 Minuten stehen gelassen und dann wieder mit Essigsäure neutralisiert. Bei dem eben beschriebenen Versuch war bei einer zugesetzten Menge von 0,4 ccm doppeltnormal *Na OH* die Zerstörung der Katalase erreicht. Bei einer Verdünnung von 1:10 erhielt man 19 ccm Extrakt, die durch 1,4 ccm doppeltnormal *Na OH* katalasefrei wurden. Die Neutralisation muß sorgfältig ausgeführt werden, damit nicht beim Mischen mit Katalaselösungen durch noch vorhandene freie *H*- oder *OH*-Ionen unberechenbare Fehler entstehen.

Mit diesem so erhaltenen neutral reagierenden proteolytischen Ferment, das eine Fibrinflocke in ca. 10 Stunden völlig verdaut hatte, wurden nun Verdauungsversuche an Katalaselösungen angestellt. Es wurden z. B. 2 ccm einer Extraktionsflüssigkeit vom Darm eines Regenwurms (R. D. E.) mit je 2 ccm einer Katalaselösung von Spirographis und einer Leberkatalase von Arion empiricorum angesetzt. Die Gemische kamen in den Thermostaten bei einer Temperatur von 35 ° C. Tabelle 1 gibt die Versuchsprotokolle.

Tabelle 1.

Einwirkung der Darmprotease des Regenwurms (R. D. E.) auf Katalasen. Temp. 35° C.

a) 2 ccm Arion-Leber + 2 ccm R. D. E.
b) 2 „ „ „ + 2 „ H_2O
c) 2 „ Spirographis + 2 „ R. D. E.
d) 2 „ „ + 2 „ H_2O
e) 2 „ Blutkatalase + 2 „ R. D. E.
f) 2 „ „ + 2 „ H_2O.

	a		b		c		d	
nach $^3/_4$h	1′ 10,65 6′ 5,50	5749[1]	1′ 9,70 6′ 5,50	4928	1′ 11,80 6′ 10,40	1097	1′ 11,35 10′ 9,20	1013
nach 20h	1′ 10,15 10′ 10,50	—	1′ 9,35 6′ 5,45	4690	1′ 9,35 10′ 9,35	—	1′ 10,10 11′ 7,90	1067

1) Der Wert der Konstanten ist in dieser und den folgenden Tabellen zur Vermeidung der Stellen hinter dem Komma mit 10^4 multipliziert.

	e		f	
nach 10′	1′ 14,18 11′ 11,55	891	1′ 13,95 11′ 11,45	858
nach 4h	1′ 15,90 10′ 15,90	—	1′ 14,00 10′ 12,10	704

Diese außerordentlich starke Wirkung des proteolytischen Fermentes vom Regenwurm wurde auch noch an anderen Katalaselösungen festgestellt. Alle bis jetzt ausgeführten Versuche beweisen die rasche Wirksamkeit auf Katalaselösungen, die in Parallele zu stehen scheint mit der kräftigen Wirkung auf eine Fibrinflocke. Das proteolytische Ferment des Regenwurms behält in der Extraktionsflüssigkeit (Wasser) lange seine Aktivität bei. Nach achttägigem Stehen im Eisschrank zersetzte es noch Fibrin und zerstörte ebenso noch Katalasegemische.

Als zweite Protease kam der Darmauszug der Larve von Dyticus marginalis zur Verwendung. Die Larve des gelbrandigen Schwimmkäfers ist ein gefräßiger Räuber. Die Verdauung ihrer Beute geschieht außerhalb ihres Körpers durch den erbrochenen Darmsaft. Dieser Saft ist eine bräunlich bis braunrote Flüssigkeit mit einem scharfen Geruch. Da mir nur acht Stück Larven zur Verfügung standen, konnte an eine Gewinnung des reinen Darmsaftes zu Verdauungsversuchen an Katalaselösungen nicht gedacht werden. Es wurde deshalb ein Darmauszug mit Wasser als Extraktionsflüssigkeit hergestellt. Der Darm wurde sorgfältig vom umgebenden Fett befreit und zerrieben. Man erhielt von acht Stück Larven 1,265 g Darmsubstanz, die 1 : 8 verdünnt wurde. Die Extraktionsdauer währte 17 Stunden unter Chloroformzusatz bei Zimmertemperatur. Das Filtrat ergab einen gelbbraunen trüben Saft, der nur schwach sauer reagierte, da bei der darauffolgenden Mischung mit Katalaselösungen oder mit Wasser die saure Reaktion verschwunden war. Zu je 2 ccm einer Blutkatalase und einer Katalaselösung von Dyticus marginalis-Imago wurden je 2 ccm des Darmauszuges von Dyticus marginalis-Larve gegeben. Während einer Digestionsdauer von 23 Stunden bei 14° C war die Blutkatalase vollständig zerstört, während Dyticus-Imago durch das proteolytische Ferment seiner Larve um die Hälfte seines K-Wertes gesunken ist. Auffällig ist noch der geringe Katalasewert in dem Darmauszug der Dyticuslarve. Eine Fibrinflocke wurde nach 23 Stunden gelöst. (Tabelle 2.)

Ähnlich in ihrer Wirkung scheint die Protease der Larve von Calosoma sycophanta zu sein, ebenfalls eines fleischfressenden Insektes. Beim

Tabelle 2.

Einwirkung von Dyticus marg. Darmauszug auf Katalase.

Temp. 14 ° C.

a) 2 ccm Blutkatalase + 2 ccm Darmextrakt v. Dyt. m. (D. m.)
b) 2 „ „ + 2 „ H_2O
c) 2 „ Dyticus-Imag. + 2 „ D. m.
d) 2 „ „ „ + 2 „ H_2O
e) 2 „ D. m.-Larve + 2 „ H_2O

	a		b		c		d	
nach 15′	1′ 13,50 3′ 11,90 10′ 7,70	2739 2701	1′ 13,00 3′ 11,35 10′ 7,50	2947 2572	1′ 13,35 3′ 11,80 10′ 7,75	2517 2608	1′ 13,15 3′ 11,90 10′ 13,88	2170 2758
nach 4h	1′ 14,10 3′ 12,60 10′ 9,02	2442 2074	1′ 12,10 — 10′ 7,25	2472	1′ 13,50 3′ 12,00 10′ 8,00	2557 2516	1′ 13,23 3′ 11,80 10′ 7,65	2484 2689
nach 23h	1′ 16,10 3′ 16,50 10′ 16,25	zer- stört	1′ 12,25 3′ 11,00 10′ 7,10	2338 2716	1′ 13,35 3′ 12,30 10′ 9,90	1778 1347	1′ 12,80 3′ 11,45 10′ 7,50	2420 2627

	e	
nach 15′	1′ 14,00 20′ 13,88	20

Herauspräparieren des Darmes war es nicht immer möglich, die in diesem enthaltene braune Flüssigkeit zu gewinnen. Der gerade verlaufende nur am Ende einmal verschlungene Darm hat im mittleren Teile eine durch die Darmflüssigkeit hervorgerufene Schwellung. Beim Freilegen des Darmes wird durch Kontraktion desselben, die vom hinteren Ende ausgeht, diese Flüssigkeit nach vorn gepreßt, ruft hier eine neue Anschwellung hervor und wird dann plötzlich entleert. Diese Bewegungen gingen so rasch vor sich, daß oftmals die Darmflüssigkeit verloren ging. Acht Stück Larven, die vorher tüchtig gefressen hatten, ergaben eine zerreibbare Darmsubstanz von 0,25 g, die 1:35 mit Wasser verdünnt und längere Zeit extrahiert wurde. Nach einer Extraktionsdauer von 2 Stunden wurde abfiltriert. Die gelbbraune trübe Flüssigkeit reagierte nur schwach sauer. Beim weiteren Mischen mit Katalaselösungen oder Wasser war diese saure Reaktion mit Lackmuspapier nicht mehr bemerkbar. Innerhalb 20 Stunden war durch den Darmauszug von Calosoma-Larve eine Fibrinflocke gelöst. Je 2 ccm Darmauszug wurden mit 2 ccm Blutkatalase und 2 ccm Wasser angesetzt. Die Einwirkung auf Katalase durch das

proteolytische Ferment der Larve des Puppenräubers ergibt sich aus Tabelle 3.

Tabelle 3.

Einfluß des Darmauszuges von Calosoma sycophanta-Larve (C. s.) auf Blutkatalase. Temp. 33 ° C.

a) 2 ccm Blutkatalase + 2 ccm C. s.
b) 2 „ „ + 2 „ H_2O
c) 2 „ C. s. + 2 „ H_2O.

	a		b		c	
nach 15′	1′ 11,50 5′ 6,25	6621	1′ 10,80 7′ 4,17	6888	1′ 12,75 5′ 11,65	972
nach 17h	1′ 13,05 7′ 12,75	168	1′ 11,35 7′ 5,00	5934	1′ 12,75 7′ 12,50	143

Die Wirkung des Darmextraktes geschah bei einer Temperatur von 33 ° C. Während 17 Stunden wird durch denselben Blutkatalase vollständig zerstört.

Von mehreren hergestellten Darmauszügen der Larve des Mehlwurms (Tenebrio molitor) konnte nur mit einem einzigen eine Wirkung auf Blutkatalase beobachtet werden. Die Extraktion der zerriebenen Darmsubstanz geschah in der Verdünnung 1 : 30. Die nach dem Filtrat erhaltene Flüssigkeit löste innerhalb 17 Stunden bei einer Temperatur von 35 ° vollständig eine Fibrinflocke, gab also eine dem Krebssaft ähnliche proteolytische Wirksamkeit. Dagegen ist die Wirkung auf eine Blutkatalase sehr schwach. In der Tabelle 4 werden die Versuchsprotokolle gegeben. Die Abnahme der K-Werte einer Blutkatalase durch den Darmauszug beträgt demnach nicht ganz $^2/_3$ des Kontrollwertes.

Tabelle 4.

Einfluß des Darmextraktes von Tenebrio molitor (T. m.) auf Blutkatalase. Temp. 35 ° C.

a) 2 ccm Blutkatalase + 2 ccm T. m.
b) 2 „ „ + 2 „ H_2O
c) 2 „ T. m. + 2 „ H_2O.

	a		b		c	
nach 15′	1′ 10,20 4′ 8,40	2811	1′ 10,85 7′ 8,55	1724	1′ 11,75 7′ 10,00	1167
nach $14^3/_4$h	1′ 15,95 7′ 13,25	1342	1′ 14,00 7′ 11,25	1583	1′ 12,15 7′ 11,10	720

Versuche mit dem Darmextrakt von Geotrupes stercorarius an einer Blutkatalase verliefen negativ, trotzdem er eine Fibrinflocke löste.

Besonderes Interesse beanspruchten noch die Versuche mit dem Darm- und Leberextrakt von Schnecken. Durch eine Arbeit von Biedermann und Moritz[1]) ist auf eine eigenartige Verdauung bei der Weinbergschnecke aufmerksam gemacht worden. Bei dieser Schnecke geschieht die Lösung des Eiweißes nicht durch den Darmsaft, sondern es soll intrazellulär, und zwar durch die Zellen der Mitteldarmdrüse, der sogenannten „Leber" verdaut werden. Von zwei Stück Helix pomatia, die längere Zeit gehungert hatten, wurden aus dem Darm und der Leber ein Wasserauszug hergestellt. An einer Fibrinflocke war durch die beiden Extrakte keine Wirkung zu beobachten. Somit könnte ich das Resultat von Biedermann und Moritz bestätigen, daß im Reagensglas durch Darm- bzw. Leberextrakte von Weinbergschnecken keine Einwirkung auf Eiweiß beobachtet werden kann. Ebenso ließen die beiden Extrakte bei einer Digestionsdauer von 25 Stunden bei 35 ° C. eine Blutkatalase unbeeinflußt.

Es fragt sich nun, durch welche Ursachen diese unterschiedliche Wirkung der einzelnen Proteasen auf Blutkatalase hervorgerufen wird. Quantitative Unterschiede in der Stärke ihrer eiweißabbauenden Tätigkeit können nicht das entscheidende Moment sein. Von den Darmauszügen wirbelloser Tiere, die ich in meinen obigen Versuchen verwendete, zeigte der des Regenwurms die stärkste proteolytische Kraft. Eine Fibrinflocke war schon nach 5—6 Stunden gelöst und nach 10 Stunden vollständig verdaut. Bedeutend schwächer und in ihrer Wirkung auf eine Fibrinflocke ungefähr gleich waren die Darmauszüge von Calosoma sycophanta-Larve und Tenebrio molitor-Larve. Dagegen ähneln sich nun in ihrer starken Wirkung auf Blutkatalase das proteolytische Ferment des Regenwurms und das der Larve des Puppenräubers, während, wie Tabelle 4 zeigt, die Protease des Mehlwurms nur eine ganz geringe Zerstörung der gleichen Katalase hervorruft. Ebenso bleibt der Darmauszug von Geotrupes stercorarius trotz seiner fibrinzerstörenden Tätigkeit ohne Wirkung auf Blutkatalase. Demnach müssen die proteolytischen Kräfte der einzelnen Proteasen wirbelloser Tiere entweder verschieden sein in ihrer Angriffsfähigkeit gegenüber derselben Katalase, oder sie sind zum mindesten nicht der ausschlaggebende Faktor bei der Zerstörung einer Katalase.

1) Biedermann und Moritz, Beiträge zur vergleichenden Physiologie der Verdauung. Über die Fermente der sogenannten Leber der Mollusken. Pflüg. Arch. **75**, 1, 1899.

Verdauungsversuche an Katalasen mit Krebssaft und Trypsinlösungen.

a) Versuche mit Krebssaft an Katalasen verschiedener Herkunft.

Da Waentig und Steche bei ihren Verdauungsversuchen an Katalaselösungen mit Krebsmagensaft und Trypsin eine unterschiedliche Zerstörung von Katalasen verschiedener Herkunft durch die gleiche Protease fanden, so wurden zunächst Untersuchungen angestellt, inwieweit und in welchem Grade Katalaselösungen der verschiedensten Tiere und Gewebe einer Zerstörung durch den Magensaft des Krebses (Astacus fluviatilis) unterliegen. Am 10. Juni 1913 wurden folgende Extrakte mit Krebssaft in der Verdünnung 1:15 gemischt:

1. Katalaseextrakt von Blaps mortisaga. Die Flüssigkeit zeigte eine trübe rötliche Farbe und reagierte schwach sauer auf blaues Lackmuspapier.
2. Extrakt aus einer Larve von Oryctes nasicornis. Farbe: dunkelbraun; Reaktion: ganz schwach sauer.
3. Extrakt aus Planarien. Farbe: weißlich trübe; Reaktion: schwach sauer.
4. Extrakt aus Raupen von Leucoma salicis. Farbe: grünlich trübe; Reaktion: schwach sauer.

Die einzelnen Extrakte wurden vor dem Mischen mit Krebssaft, der neutral reagierte, nicht neutralisiert, da man nach dem Vermischen mit diesem Verdauungsferment oder mit der gleichen Menge Wasser keine saure Reaktion gegen Lackmuspapier mehr beobachten konnte. Die saure Reaktion der verschiedenen Extrakte war in den hier verwendeten Konzentrationen ganz verschwindend, so daß durch sie irgendwelche stärkere Einflüsse auf die Katalase nicht zu befürchten waren. Nachdem zu den einzelnen Katalaselösungen je 3 ccm Krebssaft in der eben vermerkten Verdünnung gegeben worden war, wurde sofort mit der Feststellung der Katalasewerte in den einzelnen Reaktionsgemischen begonnen. Darauf wurden die Kontrollgemische auf ihren K-Wert geprüft. Zeitlich folgen also die Untersuchungen der Krebssaftgemische nach- und nebeneinander. Ich werde aber in der Tabelle 5 zur besseren Übersicht jedes Krebssaftgemisch und sein zugehöriges Kontrollgemisch nebeneinander stellen. (Tabelle 5).

Tabelle 5.

Einfluß von Krebsmagensaft auf verschiedene Katalasen.

Temp. 18 ° C.

a) 3 ccm Blaps mortisaga + 3 ccm Krebssaft 1:15
b) 3 „ „ „ + 3 „ H_2O

c) 3 ccm Oryctes nasicornis + 3 ccm Krebssaft
d) 3 „ „ „ + 3 „ H_2O
e) 3 „ Planaria gonoc. + 3 „ Krebssaft
f) 3 „ „ „ + 3 „ H_2O
g) 3 „ Leucoma salicis + 3 „ Krebssaft
h) 3 „ „ „ + 3 „ H_2O

	a		b		c		d	
Innerhalb 1 Std.	1′ 13,65 3′ 12,10 6′ 10,00	2703	1′ 13,70 3′ 12,10 10′ 7,50	2907	1′ 11,95 3′ 7,70 6′ 4,25	8980	1′ 12,20 3′ 8,10 7′ 3,63	8774
nach 17h	1′ 14,75 3′ 14,62 10′ 14,35	133	1′ 14,00 3′ 12,50 12′ 7,30	2571	1′ 14,15 3′ 13,15 10′ 10,15	1603	1′ 11,30 3′ 7,35 6′ 3,85	9352
nach 40h	1′ 14,60 3′ 14,40 10′ 14,25	117	1′ 15,70 3′ 14,05 11′ 9,00	2417	1′ 14,37 3′ 14,35 10′ 13,55	284	1′ 12,15 3′ 8,20 6′ 4,25	9124

	e		f		g		h	
Innerhalb 1 Std.	1′ 13,70 3′ 12,45 10′ 9,05	2001	1′ 13,55 3′ 12,55 12′ 9,00	1616	1′ 14,00 3′ 13,50 10′ 10,90	1208	1′ 12,20 3′ — 11′ 9,00	1321
nach 17h	1′ 14,50 3′ 14,00 10′ 12,20	833	1′ 13,45 3′ 12,25 12′ 9,25	1478	1′ 15,70 3′ 14,50 10′ 13,55	711	—	
nach 40h	1′ 14,20 3′ 14,20 10′ 13,50	244	—		1′ 14,70 3′ 14,55 10′ 13,50	411	1′ 14,05 3′ 13,36 10′ 11,32	1042

Aus dieser Tabelle geht nun deutlich hervor, daß Katalase verschiedener Herkunft gegenüber dem Krebsmagensaft eine verschiedenartige Resistenz zeigen. Oryctes nasicornis und auch noch Blaps mortisaga unterliegen einer kräftigen und schnellen Zerstörung durch das Verdauungsferment des Krebses. Bedeutend geringer und innerhalb 20 Stunden noch wenig merkbar sind die Katalaselösungen von Leucoma salicis-Raupe und Planaria gonocephala abgebaut worden.

Diese unterschiedliche Wirkung des Krebssaftes auf Katalaselösungen verschiedener Herkunft konnte nun im Laufe vieler Untersuchungen bestätigt werden. Da es unmöglich ist, alle Versuchsprotokolle hier zu veröffentlichen, so werde ich in den folgenden Tabellen durch ein Zeichen angeben, ob eine Katalaselösung durch Krebsmagensaft angegriffen wird oder nicht. Eine Verdauungswirkung werde ich durch Kreuze kenn-

zeichnen (+ = schwach, ++ = mittel, +++ = stark, − = negativ). Wo gleichzeitig Versuche mit Trypsinlösungen (in der Verdünnung 3 : 1000) vorliegen, werden diese mit angegeben. Bei allen Versuchen wirkte der Krebssaft in der Verdünnung 1 : 15 bzw. 1 : 20. Ebenso wurden Katalaselösungen und Krebssaft immer in dem Verhältnis 1 : 1 gemischt. Da es selbstverständlich nicht möglich war, alle Versuche nebeneinander, also mit dem gleichen Krebsmagensaft, auszuführen, so wurde bei jedem Versuch eine Katalase mit angesetzt, deren rasche Zerstörbarkeit durch Krebssaft bekannt war. Gewöhnlich wurde dazu Blutkatalase oder eine Katalaselösung von Arion empiricorum benutzt. Dadurch konnte man immer einen Rückschluß ziehen auf die Aktivität des in den jeweiligen Versuchen verwendeten Krebssaftes. Irgendwelche starke Veränderungen in seiner Aktivität konnten während der ganzen Untersuchungszeit nicht beobachtet werden; Änderungen in seinem Farbenton traten auf. Neben schön goldgelben Flüssigkeiten erhielt man mehr oder weniger helle,

Tabelle 6.

Der verschieden starke Abbau von Arthropodenkatalasen durch Krebssaft (a) und Trypsin (b).

Artname	Imago		Puppe		Larve bzw. Raupe	
	a	b	a	b	a	b
Vanessa antiopa	+		+			
Leucoma salicis					+	
Saturnia pavonia			−	−	++	
Lymantria dispar					+	
Sphinx ligustri					+	
Smerinthus ocellatus	+	+		++		
Deilephila euphorbiae			+			
Phalera bucephala					++	+
Apis mellifica				+		−
Rhizotrogus solstitialis	+	+?				
Calosoma sycophanta					Fettgewebe	ganze Larve
					−	+
Dyticus marginalis	−					
Blaps mortisaga	++	++				
Oryctes nasicornis					+++	++
Geotrupes silvaticus	+?					
Carabus hortensis	−	−				
Cetonia aurata	−					
Decticus verrucivorus	++					
Epeira	+	−				
Forficula auricularia	−	−				

einmal eine weißliche opaleszente, die nach wenigen Minuten gerann, aber bei Zusatz von gelber Verdauungsflüssigkeit wieder gelöst wurde. Der verwendete Krebssaft entstammte stets mehreren Tieren.

Als Ausgangspunkt für die Beurteilung der Stärke des Abbaues durch Krebssaft galten nun ebenfalls die Versuche an der Wegschnecke und an Blutkatalase. Diese Katalaselösungen unterliegen einer raschen und fast völligen Zerstörung durch Krebssaft. Die Resultate der anderen Versuche wurden nun mit diesen Ergebnissen verglichen und danach die Stärke des Abbaues festgestellt. Als Vergleichswerte wurden diejenigen benutzt, die sich bei einer Wirkungsdauer des Krebssaftes auf Katalaselösungen während 18—24 Stunden ergaben. War innerhalb dieser Zeit keine Wirkung auf Katalase hervorgerufen, so trat diese auch kaum mehr in den folgenden Stunden ein. Die meisten Versuche wurden zwei- bis dreimal wiederholt. (Vgl. Tabellen 6, 7, 8.)

Tabelle 7.

Der verschieden starke Abbau von Molluskenkatalasen durch Krebssaft (a) und Trypsin (b).

Artname	Ganzes Tier		Leber		Darm		Eiweiß- u. Zwitterdrüse
	a	b	a	b	a	b	
Anodonta	+						
Planorbis communis .		+					
Limnaeus stagnalis . .		+	+++				
Helix hortensis . . .	++	++	+++	+++			
Helix nemoralis . . .	++						
Helix pomatia	+?	+?	—		—		—
Arion empiricorum . .	++	++	+++		++		— —

Tabelle 8.

Der verschieden starke Abbau von Würmerkatalasen durch Krebssaft (a) und Trypsin (b).

Artname	Ganzes Tier		Darm		Eier
	a	b	a	b	a
Spirographis	++				
Planaria gonocephala	+				
Ascaris megalocephala	++				++
Lumbricus terrestris	++	+++	++	++	

Natürlich können diese drei Tabellen nicht Anspruch auf absolute Richtigkeit erheben, es mögen sich sicher manche Versuche nicht ganz in das von mir gewählte Schema pressen lassen und vielleicht noch manche Variationen zwischen schwach (+) und mittel (++), mittel und stark (+++) aufweisen. Jedoch konnten derartig feine quantitative Verschiedenheiten mit Hilfe der Methode, die ich anwendete, nicht erkannt werden. Die Katalaselösungen wurden so, wie sie durch Extraktion aus dem zerriebenen Gewebe gewonnen waren, also mit allen möglichen Beimengungen verunreinigt, mit Krebssaft gemischt.

Aus den Tabellen ersieht man nun, wie sich innerhalb der drei Tiergruppen Arthropoden, Mollusken und Würmer-Krebssaft — resistente und weniger resistente Katalasen verteilen. Im Vergleich zueinander zeigen also diese drei Tierstämme keine Unterschiede. Diese ergeben sich vielmehr innerhalb eines einzelnen Stammes und hier wieder merkwürdigerweise bei Katalaselösungen nahe verwandter Tiere oder sogar bei den verschiedenen Organkatalasen desselben Tieres. An Helix pomatia und Arion empiricorum kann man diese Verschiedenheiten verwandter Tiere in der Resistenz gegenüber dem Verdauungsferment des Krebses sehr gut beobachten. Während Arion empiricorum, wie ich schon früher erwähnte, einem kräftigen Abbau durch Krebssaft unterliegt, bleibt Helix pomatia fast völlig unbeeinflußt von ihm. Ihre nahen Verwandten, wie Helix hortensis und Helix nemoralis, werden dagegen vom Krebssaft wieder stark angegriffen. Ich gebe in den folgenden Tabellen 9 und 10 einige Ver-

Tabelle 9.

Einfluß von Krebssaft auf Katalasen von Arion empiricorum.
16 ° C.

a) 3 ccm Leberkatalase von Arion + 3 ccm Krebssaft 1 : 15
b) 3 „ „ „ „ + 3 „ H_2O
c) 3 „ Arion ganzes Tier + 3 „ Krebssaft
d) 3 „ „ „ „ + 3 „ H_2O
e) 2 „ Arion-Eiweißdrüse + 2 „ Krebssaft
f) 2 „ „ + 2 „ H_2O

	a		b		c		d	
nach 15′	1′ 6,75		1′ 6,75		1′ 10,00		1′ 10,85	
	—	28462	2′ 2,80	32660	—	16165	2′ 7,50	17234
	3′ 1,82		3′ 1,50		3′ 4,75		3′ 4,85	
nach 18h	1′ 12,50		1′ 6,75		1′ 13,50		1′ 11,10	
	3′ 8,50	6608	2′ 2,80	33396	3′ 12,20	2697	2′ 7,85	16882
	10′ 2,10		3′ 1,45		7′ 9,30		3′ 5,10	

	e		f	
nach 15′	1′ 13,50 3′ 11,75 11′ 8,65	2946	1′ 13,50 3′ 12,07 10′ 8,07	2505
nach 18h	1′ 13,25 3′ 11,85 10′ 7,65	2650	1′ 12,95 3′ 11,10 10′ 7,10	2900

Tabelle 10.

Einfluß von Krebssaft auf Katalasen von Helix pomatia.

a) 2 ccm Helix Darmkatalase + 2 ccm Krebssaft 1 : 15
b) 2 „ „ „ + 2 „ H_2O
c) 2 „ „ Leberkatalase + 2 „ Krebssaft
d) 2 „ „ „ + 2 „ H_2O
e) 2 „ Arion ganzes Tier + 2 „ Krebssaft
f) 2 „ „ „ „ + 2 „ H_2O.

	a		b		c		d	
nach 10′	1′ 10,07 6′ 4,15	7297	1′ 9,90 6′ 3,80	8317	1′ 7,50 6′ 1,80	12396	1′ 7,75 6′ 1,65	13209
nach 18h	1′ 11,05 8′ 3,35	7405	1′ 9,70 6′ 3,75	8175	1′ 7,20 6′ 1,55	13340	1′ 7,75 6′ 1,75	12925

	e		f	
nach 10′	1′ 12,25 10′ 3,20	6478	1′ 12,30 10′ 3,00	6809
nach 18h	1′ 13,40 10′ 7,50	2800	1′ 12,15 10′ 3,06	6654

suche wieder über die Einwirkung von Krebssaft auf Schneckenkatalase. Man sieht hier deutlich, wie im Gegensatz zu Arion empiricorum Helix pomatia sich dem Krebssaft gegenüber völlig resistent zeigt. An dem gleichen Tage liegen mit demselben Krebssaft noch Versuche an Helix pomatia Eiweißdrüse und ganzes Tier vor. Beide gleichfalls mit negativem Erfolg. Die Schuld an dem Mißerfolg kann man nicht dem Krebssaft zuschreiben, da seine Aktivität durch einen zu gleicher Zeit ausgeführten Versuch an Arion-Katalase erwiesen wird. Ebenso bleibt auch bei einem zweiten Versuch Helix-Katalase resistent gegenüber dem Krebssaft. Ein Versuch mit Magensaft der Strandkrabbe (Carcinus maenas), der in ähnlicher Weise wie der Krebssaft Katalasegemische abbaut, ergab gleichfalls keine Einwirkung an Kataläselösungen von Helix pomatia. Auch der Darm-

auszug des Regenwurms läßt die Katalase der Weinbergschnecke völlig unbeeinflußt, im Gegensatz zu der von Arion, die schnell zerstört wird. Dagegen zeigte ein Versuch, der zeitlich zwei Monate später lag, eine schwache Einwirkung des Krebssaftes auf die Katalase von Helix pomatia. Die Katalaselösungen wurden von Tieren hergestellt, die sich schon eingekapselt, also den Winterschlaf begonnen hatten. In Tabelle 11 gebe ich das Versuchsprotokoll. Doch ist auch hier im Gegensatz zu Arion die Wirkung des Krebssaftes äußerst gering. Wie die Tabellen 7 und 9 angeben, zeigen sich aber auch Unterschiede in der Resistenz gegen-

Tabelle 11.

Einfluß von Krebssaft auf Katalase von Helix pomatia, die den Winterschlaf begonnen hatte.

a) 2 ccm Helix pomatia ganzes Tier + 2 ccm Krebssaft.
b) 2 „ „ „ „ „ + 2 „ H_2O.

	a		b	
nach 20′	1′ 10,25 10′ 7,25	1671	1′ 10,90 10′ 7,55	1772
nach 320′	1′ 11,45 10′ 7,85	1821	1′ 11,20 10′ 7,80	1746
nach 24h	1′ 12,05 10′ 10,83	515	1′ 11,50 10′ 7,70	1936

über dem Krebssaft bei verschiedenen Organkatalasen von Arion empiricorum. Eiweißdrüse und Zwitterdrüse der Schnecke werden nicht vom Krebssaft angegriffen, während ein Katalaseextrakt aus der Leber in kräftiger Weise abgebaut wird. Diese letzte Erscheinung zeigt sich auch mit Ausnahme von Helix pomatia, wo eine Einwirkung kaum zu bemerken ist, bei den Leberkatalasen von Helix hortensis und Limnaeus stagnalis. Die Leberkatalasen dieser Schnecken werden am stärksten zerstört, dann folgen Darmgemische und Katalasen aus dem ganzen Tier, die ungefähr in gleich starker Weise angegriffen werden.

Bei den Katalasen der Arthropoden kann man ebenfalls derartige Verschiedenheiten in der Resistenz gegenüber dem Krebsmagensaft beobachten. Einige der untersuchten Coleopteren-Imagines werden von dem Krebssaft überhaupt nicht angegriffen, während Blaps mortisaga kräftig, Rhizotrogus solstitialis schwach und Geotrupes silvaticus kaum merklich vom Krebssaft beeinflußt werden. Ebenso bleibt Dyticus marginalis trotz mehrfacher Versuche resistent gegenüber dem Krebssaft.

Gleichfalls kann man bemerken, wie bei demselben Schmetterling (Saturnia pavonia) die Raupe vom Krebssaft angegriffen wird, während sich die Puppe resistent verhält. Bei Calosoma sycophanta, dem Puppenräuber, wird die ganze Larve schwach verdaut, die Katalaselösung aus derem Fett bleibt dagegen unbeeinflußt.

Wie soll man sich nun diese verschiedenartige Resistenz gegenüber dem Krebssaft erklären? Der von Waentig und Steche ursprünglich angeregte Gedanke, daß es sich bei der verschiedenartigen Resistenz von Katalaselösungen gegenüber dem Krebssaft um „spezifische Unterschiede verschiedener Katalasen" handeln könne, kann nicht aufrecht erhalten werden. Die größten Unterschiede in der Resistenz gegenüber dem Krebsmagensaft zeigten sich doch, wie ich schon erörterte, nicht innerhalb von Tierstämmen, sondern bei nahe verwandten Tieren bzw. bei Organkatalasen desselben Tieres. Wenn eine Verschiedenheit der Katalasen tatsächlich zwischen den einzelnen Tiergruppen bestehen sollte, dann könnte diese also nicht die Ursache zu der verschieden starken Angriffsfähigkeit des Krebssaftes sein, da gerade morphologisch und physiologisch ganz anders geartete Tiere, oftmals vom Krebssaft in ganz gleicher Weise beeinflußt werden. Bei den durch Extraktion der zerriebenen Organe mit destilliertem Wasser gewonnenen Katalasegemischen ist dieses Ferment von allerhand Beimengungen begleitet. Es wäre nicht ausgeschlossen, daß diese zum größten Teil unbekannten Verunreinigungen eine Art Giftwirkung auf das Verdauungsferment ausüben und dessen Tätigkeit hemmen. Jedoch ließ sich feststellen, daß Katalaselösungen von Helix pomatia mit Krebssaft gemischt dessen Wirksamkeit auf eine Fibrinflocke nicht beeinträchtigten. Der mitgeschleppte Ballast könnte also höchstens in der Weise hemmend einwirken, daß er das Verdauungsferment gleichsam von der Katalase ablenkt. Da nach anderen Erfahrungen anzunehmen ist, daß dessen Wirksamkeit während der Verdauung allmählich abnimmt, so könnte der Fall eintreten, daß es schon inaktiv geworden wäre, ehe die Katalase angegriffen oder völlig zerstört wäre. An einem Versuch mit defibriniertem Rinderblut, also einem sehr unreinen Extrakt, einerseits und einer durch Alkoholfällung daraus gewonnenen Katalaselösung andererseits, läßt sich diese hindernde Wirkung des Ballastes recht gut zeigen. (Tab. 12.) Je 3 ccm Rinderblut und Blutkatalase wurden mit der gleichen Menge Krebssaft in der Verdünnung 1:20 gemischt; während die gereinigte Katalaselösung schon nach 1^h zerstört ist, hat sich die Aktivität des defibrinierten Blutes nach 17^h noch nicht auf die Hälfte vermindert und ist selbst nach 41^h nicht völlig verschwunden.

Tabelle 12.

Einwirkung von Krebssaft auf ungereinigte (Rinderblut) und gereinigte Katalase (Blutkatalase).

a) 3 ccm Rinderblut + 3 ccm Krebssaft 1:20
b) 3 „ „ + 3 „ H_2O
c) 3 „ Blutkatalase + 3 „ Krebssaft 1:20
d) 3 „ „ + 3 „ H_2O.

	a	b	c	d
Sofort untersucht	1′ 12,90 3′ 10,00 5755 6′ 6,65	1′ 12,90 3′ 9,75 6294 6′ 6,25	1′ 14,00 3′ 11,90 3326 8′ 8,19	1′ 12,75 3′ 11,25 3243 8′ 7,56
nach 60′	— — —	— — —	1′ 13,55 3′ — 233 8′ 13,05	1′ 13,05 3′ 11,37 3233 8′ 7,75
nach 17h	1′ 12,55 3′ 10,90 3367 9′ 6,75	1′ 12,90 3′ 9,90 6088 6′ 6,40	— — —	— — —
nach 41h	1′ 14,50 3′ 14,15 786 13′ 11,67	1′ 12,95 3′ 10,50 5853 10′ 3,85	— — —	— — —

Die Untersuchung gereinigter Lösungen von Wirbellosen, zu deren Herstellung nur selten genügende Mengen von Material zu Gebote standen, ergab folgendes: Eine gereinigte Katalase von Arion empiricorum wurde wesentlich schneller zerstört, als der ungereinigte Extrakt. Bei Helix pomatia blieb dagegen der gereinigte Extrakt ebenso unbeeinflußt von Krebsmagensaft, wie das ungereinigte Katalasegemisch. Es müssen daher noch andere Vorgänge eine Rolle spielen. Man könnte etwa an einen Einfluß nach Art der bekannten „Schutzkolloide“ denken. Die so variable Wirkung bei gleichen Extrakten nahe verwandter Arten würde sich aber auch mit dieser Hypothese nur schwer erklären lassen.

b) Versuche mit Trypsin und Krebssaft an der gleichen Kataluselösung.

In einer Reihe weiterer Versuche sollte der von Waentig und Steche beobachtete merkwürdige Unterschied in der Resistenz derselben Katalase gegenüber den beiden Verdauungsfermenten Trypsin und Krebssaft näher charakterisiert werden. Der nächstliegende Gedanke war ja auch hier, daß diese Erscheinung durch spezifische Verschiedenheiten in der Angriffsfähigkeit der beiden Fermente bedingt wäre. Die Wirkung des Krebssaftes auf Katalase übertrifft in der Verdünnung 1:15 die

Tabelle 13.

Einfluß von Krebssaft 1:20 und Trypsin 1,4:1000 auf gereinigte Leberkatalase (Hepatokatalase) bei wechselnder Temperatur. Jeweils 3 ccm Katalaselösung + 3 ccm Verdauungsgemisch.

	Krebssaft bei 14,5 C	Trypsin bei 14,5 C	Krebssaft bei 19,5 C	Krebssaft bei 22° C	Krebssaft bei 26° C	Trypsin bei 26° C	Trypsin bei 36° C	Krebssaft bei 36° C	H_2O + Hepatokatalase bei 36° C
Sofort	1′ 9,75	1′ 9,60	—	1′ 10,10	1′ 10,45	1′ 11,00	1′ 9,60	1′ 9,90	1′ 9,55
unter-	3′ 5,50 12096	3′ 5,37 12848	—	3′ 6,25 10331	3′ 6,45 10983	3′ 6,90 10715	3′ 5,50 12629	3′ 6,10 11928	3′ 5,40 11871
sucht	5′ 3,20	5′ 2,94	—	5′ 3,90	5′ 3,80	5′ 4,10	5′ 3,00	5′ 3,30	5′ 3,20
	1′ 14,20	—	1′ 10,50	1′ 12,00	1′ 13,85	1′ 9,90	1′ 18,85	1′ 22,60	—
nach	3′ 9,50 9444	—	3′ 6,45 10615	3′ 9,10 6087	3′ — 1333	3′ 5,50 11928	3′ 11,20 12073	3′ 22,15 366	—
160 Min.	5′ 5,95	—	5′ 3,95	5′ 6,85	5′ 12,25	5′ 3,30	5′ 6,20	5′ 21,80	—
nach	—	—	—	—	1′ 13,85	—	—	1′ 13,50	—
$3^1/_2$	—	—	—	—	3′ 13,10 984	—	—	3′ 13,05 494	—
Stunden	—	—	—	—	5′ 12,65	—	—	5′ 12,90	—
nach	—	—	1′ 11,50	1′ 12,95		1′ 10,00	1′ 11,05		1′ 9,55
5	—	—	3′ 7,85 7526	3′ 11,25 3364	zerstört	3′ 6,20 10649	3′ 7,50 9167	zerstört	3′ 5,30 11703
Stunden	—	—	5′ 5,75	5′ 9,50		5′ 3,75	5′ 4,75		5′ 3,25
nach	1′ 13,00	3′ 5,35	1′ 13,10		—	1′ 10,20	1′ 12,50	—	1′ 9,80
$21^3/_4$	3′ 11,95 1715	4′ 4,25 12926	3′ 12,70 552	zerstört	—	3′ 6,95 9129	3′ 10,95 3037	—	3′ 5,60 11335
Stunden	5′ 11,10	5′ 2,95	5′ 12,45		—	5′ 4,40	5′ 9,45	—	5′ 3,45

der Trypsinlösung 3:1000. Nach Waentig und Steche erscheint diese starke Wirkung auffallend, da bei der Edestinprobe sich das Trypsin ebenso stark oder stärker wirksam als der Krebssaft erwiesen hatte. Noch auffälliger wird der Unterschied, wenn man bedenkt, daß Trypsin, wie ich zu Anfang erörterte, noch in der Verdünnung 1,4:1000 eine dem 1:20 verdünnten Krebssaft gleiche fibrinverdauende Wirkung ausübt.

Bei dem Versuche, diese merkwürdige Erscheinung zu erklären, wurde ich auf den Gedanken geführt, daß sie durch verschiedene Abhängigkeit der beiden Fermente von der Temperatur bedingt sein könne. Tatsächlich läßt sich ein sehr deutlicher Unterschied in der Wirkung beider Fermente auf eine Fibrinflocke bei verschiedenen Temperaturen nachweisen. Läßt man Krebssaft 1;20 und Trypsin 1,4:1000 bei 26° auf eine gleich große Fibrinflocke wirken, dann beginnt die Lösung zuerst in dem Krebssaftgemisch. Nach $4^1/_2{}^h$ ist durch Trypsin die Flocke erst unmerklich angegriffen, während der Krebssaft sie schon in kleine Flöckchen aufgelöst hat. Erst nach 20^h hat auch das Trypsin die Flocke völlig gelöst. Bei 36° erfolgt dagegen die Wirkung der beiden Fermente mit gleicher Schnelligkeit.

Die gleiche Abhängigkeit ergibt sich auch bei der Einwirkung der beiden Proteasen auf Katalaselösung (vgl. Tab. 13). Der Krebssaft beginnt hiernach seine zerstörende Tätigkeit schon bei 14,5°. Sie nimmt mit steigender Temperatur rasch zu und hat bei 26° bereits fast das Maximum erreicht, denn weitere Steigerung bis 36° bewirkt nur noch geringe Zunahme. Trypsin dagegen wirkt bei 14,5° überhaupt noch nicht, erst bei 26° zeigt sich in $21^3/_4{}^h$ eine geringe Zerstörung der Katalase, die dann bis 36° weiter zunimmt.

Es wurde zu diesen Versuchen jeweils frisch entnommener Krebssaft bzw. frisch hergestellte Trypsinlösung verwendet. Die Verdünnung und Mischung geschah bei 15°, darauf wurden die einzelnen Gemische in Bäder von der gewünschten Temperatur gebracht.

Dies verschiedene Verhalten der beiden Fermente ist biologisch wohl verständlich, da das Trypsin im Darm der Warmblüter normal bei etwa 37—39° wirkt, während im Magen des Krebses Temperaturen von 14—16° wohl nur ausnahmsweise überschritten werden.

Für die Wirkung des Trypsins liegt die untere Grenze etwa bei 16—18°; Krebssaft dagegen wirkt noch bei Temperaturen, die wenig über 0° betragen, wie Tab. 14 zeigt. Selbst bei 4,5°, einer für Fermentreaktionen sehr niedrigen Temperatur, ist hiernach noch eine deutliche Zerstörung von Katalase wahrzunehmen.

Tabelle 14.

Einfluß der Temperatur auf die Tätigkeit des Krebssaftes an Katalase. 3 ccm Hepatokatalase + 3 ccm Krebssaft 1:20.

	4,5°	8,5°	14°	25°	37° C
Sofort untersucht	1′ 20,53 3′ 12,30 11035 5′ 7,43	1′ 14,70 3′ 8,70 11179 5′ 5,25	1′ 10,50 3′ 6,33 11121 5′ 3,77	1′ 9,93 3′ 6,50 9872 5′ 4,00	1′ 11,05 3′ 6,75 10897 5′ 4,05
nach 2h	— — —	1′ 11,10 3′ 7,75 9803 5′ 4,50	1′ 10,85 3′ 6,90 10352 5′ 4,25	1′ 12,35 3′ — 1410 6′ 10,50	1′ 13,40 3′ 13,30 329 5′ 13,00
nach 5h	— — —	— — —	1′ 10,55 3′ 6,40 10395 5′ 4,05	zerstört	zerstört
nach 29h	1′ 11,15 3′ 7,75 7447 5′ 5,60	1′ 12,10 3′ 9,35 4837 5′ 7,75	1′ 13,00 3′ 11,95 1715 5′ 11,10		— — —

Verdauungsversuche an Katalase mit Erepsinlösungen.

Die eben erörterte verschiedene Temperaturempfindlichkeit von Trypsin und Krebssaft reicht jedoch zur Erklärung ihrer verschiedenen Wirkung auf Katalase nicht aus, da beobachtet wurde, daß auch bei 36° eine Trypsinlösung, die Fibrin ebenso schnell angriff als Krebssaft, auf Katalase viel schwächer wirkte. Es mußte also zur Erklärung noch ein weiterer Faktor herangezogen werden.

Zuerst von Cohnheim[1]) ist festgestellt worden, daß bei der Verdauung im Wirbeltierdarm neben den altbekannten Fermenten Pepsin und Trypsin noch ein drittes, das Erepsin, tätig ist. Die Rolle dieser drei hat man bis in die letzte Zeit folgendermaßen geschildert: Pepsin greift in saurer Lösung genuines Eiweiß an und peptonisiert es, Trypsin greift in alkalischer Lösung ebenfalls genuine Eiweiße an, baut sie aber bis zu Aminosäuren ab, das Erepsin dagegen vermag nur Peptone und Polypeptide zu spalten. Es bestand nun die Möglichkeit, daß der Krebssaft seiner Wirkungsweise nach dem Erepsin näher verwandt sei als dem Trypsin und die Katalase für ein solches Ferment leichter angreifbar sei. Zur Klärung dieses Punktes mußte zunächst festgestellt werden, ob das Erepsin des Wirbeltierdarmes überhaupt auf Katalase wirkt.

Die Herstellung der Erepsinlösung erfolgte nach dem Verfahren von Cohnheim. Der Darm einer Katze, die sich in Verdauung befand, wurde aufgeschlitzt und abgespült, die abgeschabte Schleimhaut gründ-

1) Z. f. physiol. Chem. **33**, 451, 1901.

lich mit Quarzsand verrieben und mit 100—150 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Die Filtration nach 16—20h ergab eine gelbliche oder gelbrötliche trübe Flüssigkeit. Zur Erkennung der peptolytischen Wirkung des Extraktes wurde ein neues, von der Firma Hoffmann-La Roche & Co. hergestelltes, sehr reines Seidenpepton verwendet. Dieses mehlige Pulver hat nur noch ein schwach gelbliches Aussehen und löst sich in Wasser je nach der gewählten Konzentration mit hell- bis dunkelgelber Farbe. Durch Neutralisieren mit Natriumhydroxyd findet kein Farbenumschlag ins Grünliche mehr statt. Bei Zusatz von gesättigter Ammonsulfatlösung ergibt sich nur noch ein unbedeutender Niederschlag. Albumosen sind also fast gar nicht mehr vorhanden. Der Firma Hoffmann-La Roche & Co., Grenzach, danke ich auch hier bestens für Überlassung der Proben.

Zum Nachweis des Pepton Roche wurde die Biuretprobe benutzt. Es gibt dabei eine blutrote Farbe, die sofort auftritt und auch bei längerem Stehen keiner Veränderung unterliegt. Bei der Untersuchung auf Peptase wurde zu 2—3 ccm einer 2proz. Peptonlösung die gleiche Menge der zu prüfenden Fermentlösung gesetzt, etwas Toluol zugefügt und das Gemisch in den Brutschrank gestellt. Die Abnahme der Färbungsintensität bei der Biuretprobe gab dann einen ungefähren Anhalt für die Zerstörung des Peptons (vgl. Tab. 15).

Tabelle 15.

Wirkung einer Erepsinlösung auf Pepton Roche bei 36°.

	sofort	nach 4h	nach 8h	nach 25h
Erepsin + Pepton	dunkelrot	schwach hellrot	farblos	—
H_2O + Pepton	dunkelrot	—	—	dunkelrot

Die Wirkung des Katzendarmextraktes auf Pepton Roche ist sehr deutlich; Erepsin ist demnach vorhanden. Läßt man nun diesen Extrakt auf eine Katalaselösung wirken, so ergibt sich, daß diese abgebaut wird. (Vgl. Tab. 16.) Katalase unterliegt also der Verdauung durch einen Darmextrakt, der ein peptolytisches Ferment enthält.

Tabelle 16.

Einfluß eines Katzendarmauszuges, dessen proteolytische Kraft durch Pferdeserum gehemmt wurde, auf Katalaselösung.

a) 5 ccm Hepatokatalase + 4 ccm H_2O
b) 5 „ „ + 2 „ Erepsin + 2 ccm H_2O
c) 5 „ „ + 2 „ Serum + 2 „ H_2O

d) 5 ccm Hepatokatalase + 2 ccm Serum + 2 ccm Erepsin
e) 2 „ Serum + 7 „ H_2O

	a	b	c	d	e
nach 20′	2′ 19,24 4′ 15,49 4156 7′ 11,92	2′ 18,50 4′ 14,56 4764 7′ 10,69	2′ 18,58 4′ 15,27 4482 7′ 11,09	2′ 19,89 4′ 16,30 4360 7′ 12,04	2′ 23,20 5′ 22,75 790 10′ 20,06
nach 49h	2′ 18,65 4′ 16,55 2711 7′ 13,65	2′ 21,25 4′ 21,35 225 7′ 21,00	2′ 23,76 4′ 21,25 2450 7′ 17,92	2′ 25,95 4′ 25,15 828 7′ 23,59	inaktiv

Der Schluß, daß diese Zerstörung das Werk einer Peptase sei, die Katalase also einen pepton- bzw. polypeptidenartigen Charakter trage, wird dadurch erschwert, daß ein solcher Darmauszug, wie durch Versuche festgestellt wurde, auch Fibrin ergreift, also auch eine Protease enthält. Bemühungen, diese Komponente durch weitere Reinigung des Extraktes zu beseitigen (fraktionierte Aussalzung mit Ammonsulfat nach Cohnheim und fraktionierte Fällung mit hochprozentigem Alkohol nach Vernon[1]) schlugen fehl, da auch die ereptische Wirkung auf ein Minimum sank.

Dagegen gelang es, auf dem in neuerer Zeit von Glaeßner und Stauber[2]) eingeschlagenen Wege zum Ziele zu kommen. Diese haben durch Zusatz von Blutserum des Pferdes die proteolytische Komponente des Darmauszuges gehemmt, während die ereptische ihre volle Wirksamkeit behielt. Die Nachprüfung ergab die Richtigkeit dieser Befunde. Vermengt man nun eine Erepsinlösung mit Pferdeserum und läßt dies Gemisch auf Katalase wirken, so erhält man ein Resultat, wie es Tab. 16 zeigt. Die mit Serum vorbehandelte Verdauungslösung griff Katalase nur wenig schwächer an, als die unveränderte Erepsinlösung. Das gleiche Gemisch hatte keine Wirkung auf Fibrin, baute aber Pepton Roche ab. Die Wirkung des Darmauszuges auf Katalase muß daher vorwiegend der peptolytischen Komponente zugeschrieben werden.

Die von Waentig und Steche und auch von mir beobachtete Wirkung von Trypsin auf Katalase steht mit diesem Befunde nur scheinbar in Widerspruch. Es ist nämlich durch neuere Untersuchungen wahrscheinlich geworden, daß das Trypsin durchaus kein einheitliches proteolytisches Ferment ist. Vgl. darüber z. B. Oppenheimer, Die Fermente: „Es ist sehr wahrscheinlich, daß das, was wir Trypsin nennen, ein Ge-

1) Journ. of Physiol. **30**, 330, 1903.
2) Zeitschr. f. biol. Chem. **25**, 204, 1910.

misch von peptolytischen Enzymen mit anders gearteten Fermenten ist, die das eigentliche Proteinmolekül zunächst angreifen, und erst in solche Stücke spalten, die für die peptolytischen Enzyme angreifbar sind." Und an anderer Stelle: „Wenn man hier auch Trypsin untersucht, so untersucht man doch ausschließlich die peptolytische Wirkung des Trypsins, die also nicht notwendig denselben Gesetzen zu folgen braucht, wie die proteolytische."

Differentialversuche deuten nun darauf hin, daß auch in dem Fermentgemisch des Trypsins die peptolytische Komponente die Wirkung auf Katalase ausübt. Es wurde zunächst eine Trypsinlösung in der Verdünnung 1,4:1000 hergestellt (Trypsin 1), dann eine zweite, die aus der ersten durch nochmaliges Verdünnen mit der gleichen Menge Wasser gewonnen war (Trypsin 2). Als dritte Lösung kam ein fünf Tage alter Auszug aus Katzendarm zur Verwendung (Erepsin). In Tab. 17 wird

Tabelle 17.

Einwirkung von Trypsin- und Erepsinlösungen auf Fibrin.

Verdauungslösungen	Nach 18 Stunden
A. Trypsin 1 + Fibrin	In kleine Flöckchen gelöst
B. Trypsin 2 + Fibrin	Die Wirkung etwas schwächer als bei A
C. Erepsin + Fibrin	Kaum merklich angegriffen

zunächst die Wirkung dieser drei Lösungen auf Fibrin gezeigt. Hier erweist sich das Trypsin als bedeutend stärker. Dagegen ergab eine gleichzeitig angestellte Peptonprobe nur für den Darmauszug ein positives Resultat. Dieser ist also vorwiegend aus peptolytischem Ferment zusammengesetzt. Alle drei Lösungen spalteten aus Glycyl-l-Tryptophan Tryptophan ab. Läßt man nun diese drei Gemische auf Katalase wirken, so steht der Abbau im direkten Verhältnis zur peptolytischen, im umgekehrten zur proteolytischen Komponente. Immerhin lassen beide Trypsinlösungen noch einen deutlichen Abbau der Katalase erkennen, obwohl sie das Pepton Roche gar nicht angriffen. (Vgl. Tab. 18.) Ob die pepto-

Tabelle 18.

Einfluß von Trypsin- und Erepsinlösungen auf Hepatokatalase bei 36° C.

a) 3 ccm Hepatokatalase + 3 ccm H_2O
b) 3 „ „ + 3 „ Erepsin
c) 3 „ „ + 3 „ Trypsin 1
d) 3 „ „ + 3 „ Trypsin 2

	a	b	c	d
nach 20 Min.	1′ 16,15 3′ 11,76 6244 6′ 7,87	1′ 16,40 3′ 12,66 5516 6′ 8,69	1′ 15,55 3′ 11,47 6037 6′ 7,76	1′ 15,01 3′ 11,22 6038 6′ 7,49
nach 18h	1′ 14,81 3′ 11,00 6145 6′ 7,30	1′ 16,79 3′ 14,34 3665 6′ 11,01	1′ 15,60 3′ 12,55 4271 6′ 9,54	1′ 15,10 6′ 8,30 5385 9′ 5,60

lytischen Bestandteile des Trypsins sich von denen des Erepsins qualitativ oder nur quantitativ unterscheiden, ist noch ungeklärt. Mit Trypsinlösungen bis zu 5 Proz. konnte kein Pepton abgebaut werden (vgl. Tab. 19), Glaeßner und Stauber haben aber mit 25proz. Trypsinlösung Pepton in abiurete Produkte übergeführt.

Tabelle 19.

Einwirkung von Krebssaft in der Verdünnung 1:20, Trypsinlösung 5proz., Trypsinlösung 1,4:1000 auf 2proz. Pepton Roche.

	Biuretproben		
	sofort	nach 16h	nach 47h
Tr. 1 (5proz.) + Pept. R. .	tief rot	tief rot	tief rot
Tr. 1 + H_2O	violett	violett	violett
Tr. 2 (1,4:1000) + Pept. R.	tief rot	tief rot	tief rot
Tr. 2 + H_2O	bläulich	—	—
Kr. (1:20) + Pept. R. . .	tief rot	schwach violett	schwach violett
Kr. + H_2O.	schwach violett	schwach violett	schwach violett

Die peptolytische Wirkung des Krebssaftes.

Bei den Verdauungsversuchen mit den Darmextrakten wirbelloser Tiere war nun gleichfalls beobachtet worden, daß eine starke Wirkung auf Katalase durchaus nicht mit einer solchen auf Fibrin zusammenfiel. Es lag daher die Vermutung nahe, daß man es hier mit Fermentgemischen zu tun hat, in denen die proteolytische und peptolytische Komponente quantitativ anders verteilt ist, als im Trypsin der Wirbeltiere. Peptolytische Wirkungen sind von Abderhalden und Heise[1]) bei zahlreichen Wirbellosen nachgewiesen. Für den Magensaft des Krebses kann ich ihre Befunde bestätigen. (Vgl. Tab. 19.) Schon in 16 Stunden hatte bei diesem Versuch der Krebssaft in der Verdünnung 1:20 das Pepton abgebaut, zeigte also eine Stärke, wie ich sie bisher bei keinem Katzenerepsin beobachten konnte. Das Trypsin wirkte im Gegensatz dazu nicht

1) Zeitschr. f. physiol. Chem. 62, 136, 1909.

auf Pepton ein, in einer Verdünnung, bei der es auf Fibrin etwa gleich stark wirkt wie der Krebssaft. Das Verhältnis der proteolytischen und peptolytischen Komponente ist also tatsächlich in diesen beiden Fermenten sehr verschieden. Berücksichtigt man die starke Wirkung des Krebssaftes auf Katalase, so unterstützt auch die Betrachtung dieses Fermentes den Schluß, daß die Hauptrolle beim Abbau der Katalase die peptolytischen Fermente spielen. Es lassen danach die hier geschilderten Versuche insgesamt die Vermutung berechtigt erscheinen, daß die Katalase kein genuines Eiweiß ist.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Das im Darm der Wirbeltiere vorkommende Verdauungsferment Erepsin, das alle Komplexe aufspaltet, die nach dem Angreifen der genuinen Proteine durch Pepsin und Trypsin entstehen, zerstört auch Katalase.

2. Dies berechtigt zu der Annahme, daß in der Katalase eine chemische Substanz vorliegt, die zwar eiweißartiger Natur ist, da sie dem Abbau durch Proteasen unterliegt, nicht aber zu der Gruppe der Eiweißkörper gerechnet werden kann, welche lediglich von Trypsin angegriffen werden.

3. Die unterschiedliche Wirkung von Krebssaft (sowie wahrscheinlich verschiedener anderer Verdauungsfermente von Wirbellosen) und Trypsin beruht darauf, daß beide Arten von Gemischen aus einer ereptischen und einer proteolytischen Komponente bestehen.

4. Die Verschiedenheit der Wirkung erklärt sich daraus, daß
   a) die Temperaturempfindlichkeit beider Fermentgemische verschieden ist,
   b) im Krebssaft die ereptische, im Trypsin des Handels die proteolytische Komponente überwiegt.

5. Eine eigentümliche Verschiedenheit der Angriffsfähigkeit verschiedener Katalasen, auch nahe verwandter Tierarten, durch Krebssaft wurde festgestellt, ohne daß bisher eine einwandfreie Erklärung dafür gegeben werden kann.

Lebenslauf.

Ich, Ernst Kurt Winkler, evangelisch-lutherisch, wurde am 11. November 1890 geboren als ein Sohn des Papierfabrikanten Oskar Winkler in Rothental im Erzgebirge. Ich besuchte dort 4 Jahre die Volksschule, darauf 3 Jahre lang die Selekta in Olbernhau. 1904 kam ich auf die Realschule zu Frankenberg i/Sa. und 1907 auf die Oberrealschule zu Chemnitz, die ich 1910 mit dem Reifezeugnis verließ. Seit dieser Zeit studierte ich an der Universität zu Leipzig zunächst 2 Semester Germanistik und Geschichte. Sommer 1911 besuchte ich die Jenaer Universität, studierte dort neben Germanistik auch Naturwissenschaften. Diesem letzteren Fache widmete ich mich dann ausschließlich in Leipzig.

Meine akademischen Lehrer waren: v. Bardeleben, Brandenburg, Chun, Detmer, Doren, Eucken, Hempelmann, Hirt, Lamprecht, Leitzmann, Linck, Meisenheimer, Merker, Paal, Pfeffer, Plate, Rinne, Simroth, Steche, Waentig, Weule, Wilcken, Witkowski, Woltereck, Wundt.